

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian yaitu mencit yang diberi beberapa perlakuan, sehingga jenis penelitian ini termasuk ke dalam *penelitian eksperimental* (Nazir, 2003). Adapun yang menjadi objek penelitian adalah pengaruh pemberian ekstrak temulawak terhadap aspek reproduksi mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan.

#### B. Desain Penelitian

Desain penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini dilakukan dengan cara memberikan ekstrak rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) kepada mencit secara oral menggunakan *gavage*. Kelompok perlakuan terdiri dari 3 kelompok yang masing-masing kelompok diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan dosis 140 mg/Kg bb, 280 mg/Kg bb, atau 700 mg/Kg bb. Selain itu, terdapat pula kelompok kontrol yang terdiri dari kelompok mencit yang hanya diberi akuades setiap harinya

Jumlah sampel pengulangan dihitung dengan rumus Federer (1983):

$$(T-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3n - 3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$n \geq 18/3$$

$$n \geq 6$$

Ket: T = Jumlah perlakuan 4

n = Jumlah replikasi 6

Setelah itu, dilakukan randomisasi untuk pengelompokan. Pengelompokan dilakukan dengan tujuan menghilangkan bias. Pengelompokan dilakukan dengan memberi kode 1-24 pada mencit yang akan menempati kandang yang telah diberi

kode A, B, C dan D sebagai perwakilan setiap dosis. Hasil pengelompokan terdapat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Hasil Randomisasi Mencit Jantan

1 13C	2 9D	3 14B	4 15A	5 3A	6 16A
7 22D	8 8C	9 12A	10 10D	11 24A	12 5A
13 17C	14 20D	15 1D	16 21C	17 18B	18 7D
19 23C	20 19B	21 11C	22 6B	23 2B	24 4B

Keterangan :

- A : Dosis 0 mg/KgBB (Kontrol)  
 B : Dosis 140 mg/KgBB  
 C : Dosis 280 mg/KgBB  
 D : Dosis 700 mg/KgBB  
 1, 2, 3, dst : Nomor mencit

Berdasarkan randomisasi mencit, maka didapatkan penempatan mencit pada setiap kandangnya dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Penempatan Mencit Berdasarkan Hasil Randomisasi

Kandang	Dosis	Kode Mencit					
A	0 mg/KgBB (Kontrol)	15	3	16	12	24	5
B	140 mg/KgBB	14	18	19	6	2	4
C	280 mg/KgBB	13	8	17	21	23	11
D	700 mg/KgBB	9	22	10	20	1	7

### C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan. Sedangkan sampel pada penelitian ini adalah mencit jantan sebanyak 24 ekor. Mencit yang digunakan adalah mencit jantan

yang berumur sekitar 8-10 minggu dan yang memiliki berat badan konstan 25-30 gr. Lalu diamati aspek reproduksinya setelah diberi ekstrak rimpang temulawak secara oral menggunakan jarum *gavage* selama 30 hari. Aspek reproduksi yang dianalisis meliputi, berat organ reproduksi, morfologi, motilitas dan sayatan histologinya.

#### **D. Waktu Dan Lokasi Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Maret - Mei 2015 dan dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Rumah Hewan, Kebun Botani, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Pemeliharaan mencit dilakukan di Rumah Hewan, sedangkan pengamatan kualitas sperma dilakukan di Laboratorium Struktur Hewan.

#### **E. Prosedur penelitian**

##### **1. Tahap Pra-Penelitian**

##### **a. Penyiapan Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat dan bahan untuk proses pemeliharaan hewan percobaan, pembuatan ekstrak rimpang temulawak, pemberian ekstrak rimpang temulawak pada hewan percobaan sebagai perlakuan dan analisis kualitas sperma pada mencit jantan yang telah diberi ekstrak temulawak. Pada proses pemeliharaan dibutuhkan kandang mencit berukuran 30 x 20 x 12 cm beserta tutupnya. Kandang yang dibutuhkan sebanyak lima unit kandang yang berisi 6 sampai 7 ekor mencit jantan.

Pembuatan ekstrak dibutuhkan satu kilogram rimpang temulawak yang digiling oleh penggilingan atau *blender*. Pemberian ekstrak temulawak menggunakan jarum *gavage* dan *syringe* 1 ml. Ekstrak temulawak yang telah diperas kemudian dikirim ke laboratorium Farmasi ITB untuk dilakukan proses freeze-Dried. Ekstrak yang telah selesai kemudian di

timbang menggunakan timbangan *Dial-O-Gram* dan dilarutkan dalam 0,3 ml aquades untuk setiap dosisnya.

Analisis pengaruh ekstrak temulawak terhadap kualitas spermatozoa membutuhkan alat bedah yang digunakan untuk mengambil spermatozoa dari bagian epididimis, yang selanjutnya dimasukan kedalam larutan *Phosphat Buffered Saline* (PBS) (Komposisi pada lampiran 4) yang ditampung di kaca arloji. Analisis pengaruh ekstrak temulawak terhadap kualitas spermatozoa pada mencit dilakukan menggunakan Mikroskop Listrik Binokuler. Alat dan bahan pada penelitian ini dapat dilihat secara lengkap pada Lampiran 2.

#### **b. Pembuatan Ekstrak Temulawak**

Temulawak yang digunakan adalah galur Roxb. Dengan usia 11- 12 bulan (Rahardjo, 2001; Setyawan, 2003 dalam Malya 2014). Rimpang temulawak diperoleh dari pasar tradisional Tilil, Dipati Ukur, Bandung. Pembuatan ekstrak temulawak menggunakan metode *aqueous extract* atau ekstraksi air, yang merupakan merupakan modifikasi dari metode Halim *et al.*, (2012).. Hal ini dilakukan sebagai adaptasi konsumsi temulawak dengan pelarut air yang biasa dilakukan oleh masyarakat luas. Selain itu, konsumsi temulawak yang diekstraksi dengan air memiliki potensi sebagai anti fertilitas (Chattopadhyay, 2004).

Proses pembuatan ekstrak diawali dengan proses pembuatan serbuk dari rimpang temulawak. Temulawak yang masih berupa rimpang dicuci bersih. Setelah itu temulawak di potong-potong sehingga berukuran lebih kecil. Temulawak yang sudah dipotong-potong dimasukan ke dalam *Blender* untuk dihaluskan. Setelah temulawak tersebut halus, maka airnya diperas dan disimpan dalam toples. Kemudian hasil perasan temulawak tersebut dibawa ke Laboratorium Farmasi ITB untuk selanjutnya dilakukan *freeze-dried*.

Setelah ekstrak dalam bentuk serbuk, lalu dilakukan penimbangan sesuai dengan dosis yang telah ditentukan. Ekstrak yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam plastik *zipper* kemudian setiap dosis dilarutkan dalam aquades sebanyak 0,3 ml. Ekstrak diberikan pada mencit jantan dengan cara *gavage* (Riyanto, 2003). Untuk dosis 0 mg/bb dikelompokkan sebagai kontrol. Maka perlakuannya diberi murni aquades tanpa ekstrak temulawak. Proses pemberian *gavage* dapat dilihat pada gambar 3.2.

Pada hari ke-30 mencit jantan di euthanasia dengan cara dilakukan anestesi sebelumnya. Setelah mencit siap dibedah, isolasi epididymis dan testis dilakukan. Setelah itu penelitian masuk ke dalam tahap koleksi sperma untuk analisis kualitas sperma pada mencit jantan.



Gambar 3.1 Proses Pemberian Ekstrak Menggunakan *Gavage*  
(Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2015)

### c. Penentuan Dosis

Penelitian ini menggunakan tiga dosis, yaitu 140 mg/kg BB, 280 mg/kg BB, dan 700 mg/kg BB. Penentuan dosis ini berdasarkan pada penelitian Yadav dan Jain (2010 dan 2011) yang bertujuan untuk melihat efek anti implantasi pada tikus putih setelah diberi ekstrak air *Curcuma longa*. Pada penelitain ini yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) jantan Swiss Webster yang berusia 3 bulan. Maka dilakukanlah konversi

dosis dengan nilai konversi 0,14 untuk tikus putih 200 gr ke mencit 20 gr. Nilai konversi ini berdasarkan tabel konversi Laurence & Bacharach (1946) dalam Daud, 2012. Perhitungan konversi dapat dilihat pada Lampiran 4.

#### **d. Persiapan Mencit dan Aklimasi**

Mencit yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Pasar Baros, Kota Cimahi. Kemudian mencit dipelihara di Rumah Hewan UPI yang memiliki suhu minimum 25°C dan suhu maksimum 29°C dengan suhu rata-rata 27°C. Titik minimum kelembaban relatif ruangan adalah 76% dan titik maksimum 92% dengan kelembaban relatif rata-rata 83% (Malya, 2014). Mencit jantan yang dipakai berusia 12 minggu dengan bobot konstan 25 – 30 g.

Penempatan mencit jantan di dalam kandang menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap). Kandang yang digunakan berukuran 30 x 20 x 12 cm, terbuat dari plastik bening dan memiliki penutup yang terbuat dari besi. Dasar kandang diberi sekam dan diganti secara berkala.

Mencit diaklimasi selama satu minggu dengan menempatkannya di kandang yang berbeda dan diberi pakan standar untuk anak babi CP 551 (Rugh, 1967 ; Priyandoko, 2004). Setelah diaklimasi selama seminggu, maka proses pemberian ekstrak temulawak secara oral dapat diberikan.

## **2. Tahap Perlakuan**

### **a. Pemberian Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*)**

*Treatment* dengan pemberian ekstrak rimpang kuyit ini dilakukan selama 30 hari secara oral. Pemberian ekstrak dilakukan dengan menggunakan jarum *gavage*. Ekstrak yang diberikan pada mencit sebanyak 0,3 ml dengan dosis yang berbeda-beda pada setiap kelompok yaitu dosis 0 mg/bb, 140 mg/kg bb, 280 mg/kg bb dan 700 mg/kg bb dengan salah satu kelompok hanya mendapatkan *treatment* aquades saja. Setelah masa perlakuan berakhir, mencit-mencit ini kemudian dilakukan

*euthanasi* dengan cara dibius terlebih dahulu menggunakan kloroform kemudian organ reproduksi diambil dan dilakukan perhitungan motilitas, abnormalitas, penimbangan berat organ, penghitungan jumlah spermatozoa dan sayatan histologi testis.

#### **b. Menghitung Berat Organ Reproduksi (testis)**

Proses *euthanasi* yang dilakukan pada mencit jantan, salah satunya bertujuan untuk mengambil organ reproduksinya yaitu testis. Testis diambil karena bertujuan untuk diukur beratnya dan nantinya akan dibuat sayatan histologi. Pengukuran berat testis dilakukan dengan menimbang kedua testis pada timbangan anakutik yang terdapat di laboratorium. Kemudian selanjutnya hasil penimbangan berat organ akan diolah menggunakan statistik untuk melihat signifikansinya.

#### **c. Menghitung Motilitas Sperma**

Untuk menghitung motilitas sperma, cauda epididimis diambil lalu dipotong-potong dan dimasukkan dalam 1 ml larutan NaCl 0,9 %. Untuk menghitung jumlah spermatozoa ditentukan dengan cara mengisap suspensi spermatozoa dengan pipet leukosit sampai tanda 1,0. Pipet yang telah berisi suspensi spermatozoa kemudian diencerkan dengan larutan *Phosphat Buffer Saline* hangat dengan suhu 35°C sampai tanda 11, dikocok supaya homogen. Sebelum menghitung spermatozoa dibuang agar yang terhitung nanti adalah bagian yang benar-benar mengandung spermatozoa homogen. Suspensi spermatozoa ditetaskan di kamar hitung Neubauer, dihitung jumlah spermatozoa pada 16 kotak dibawah mikroskop perbesaran 400 kali. Hasil perhitungan merupakan jumlah spermatozoa dalam 10-5mL suspensi spermatozoa. Motilitas spermatozoa dapat diamati dengan cara meneteskan spermatozoa ke bilik hitung Neubauer dengan perbesaran 400 kali. Motilitas sperma ditentukan dari 100 spermatozoa dalam satu lapang pandang. Motilitas spermatozoa

dinilai berdasarkan persen spermatozoa dengan motilitas baik, yaitu spermatozoa yang bergerak lurus ke depan, cepat, lincah dan aktif (Kaspul, 2004).

Metode penilaian motilitas sperma menurut Soeharno (1987) sebagai berikut:

- a. *Grade 0* : Spermatozoa tidak bergerak sama sekali.
- b. *Grade 1* : Spermatozoa bergerak sangat lambat/ bergerak sedikit sekali.
- c. *Grade 2* : Spermatozoa bergerak ke depan dengan kecepatan sedang/bergerak *zigzag* dan berputar putar.
- d. *Grade 3* : spermatozoa bergerak ke depan atau lurus seperti roket.

#### **d. Menghitung Jumlah sperma**

Penghitungan jumlah spermatozoa terdapat beberapa cara, yaitu dengan menghitung jumlah spermatozoa per ejakulat atau dengan menghitung jumlah spermatozoa per volume ejakulat. Cara yang umum digunakan untuk perhitungan sperma adalah dengan menghitung jumlah sperma per ejakulat. Menurut Soeharno (1987), pemeriksaan dilakukan untuk menghitung jumlah sperma dilakukan melalui dua tahap, yaitu:

- a. Menghitung secara perkiraan, berapa jumlah sperma per lapang pandang
- b. Jumlah spermatozoa per ml ditentukan dengan menggunakan kamar hitung improved Neubauer.

Penggunaan haemositometer dan larutan pengencer dibutuhkan dalam penghitungan jumlah spermatozoa. Pertama, organ epididimis yang terdapat pada *cadaver* segera diambil dan dimasukkan ke dalam larutan PBS (*Phosphat Buffered Saline*). Kemudian, organ tersebut dicacah sehingga sel sperma yang terdapat didalam epididimis bersatu dalam larutan PBS. Selanjutnya adalah proses pengenceran sperma. Sperma diencerkan dengan



cara menghisap sperma menggunakan Haemositometer leukosit sampai sperma mencapai angka 1 dan selanjutnya larutan pengencer dihisap sampai 101. Pipet leukosit dikocok menurut angka 8 selama 15 sampai 20 menit. Kemudian tiga tetes pertama dibuang sebelum ditetaskan ke dalam kamar hitung. Biarkan selama 15 menit agar semua sel mengendap atau merata di dalam kamar hitung. Selanjutnya sel spermatozoa dihitung dengan berbagai cara di bawah ini:

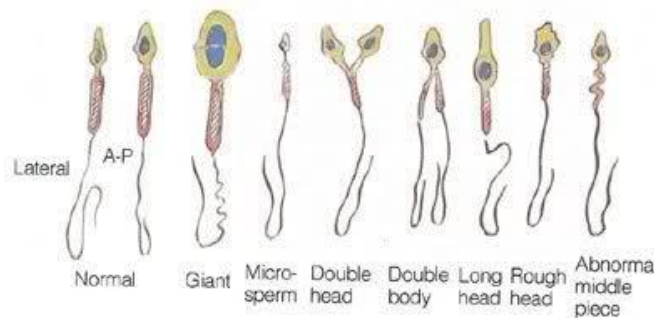
- a) Hasil perhitungan spermatozoa dari lima bidang A, B, C, D, dan E dikalikan 2000 dikalikan pengenceran.
- b) Hasil perhitungan spermatozoa dari bidang E dikalikan 10.000 dikalikan pengenceran.
- c) Hasil perhitungan spermatozoa dari bagian E1, E2, E3, E4 dan E5 dikalikan 50.000 dikalikan pengenceran.
- d) Hasil perhitungan spermatozoa dari salah satu bidang A/B/C/D/E;
  - 1) Untuk pengenceran 10 kali : dikali 100.000
  - 2) Untuk pengenceran 20 kali : dikali 200.000
  - 3) Untuk pengenceran 100 kali : dikali 1.000.000
  - 4) Untuk pengenceran 200 kali : dikali 2.000.000

Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali pada setiap sperma yang dihitung, kemudian diambil rata-rata dari ketiga pengulangan tersebut.

#### **e. Analisis Morfologi Sperma**

Spermatozoa dapat berbentuk lain dari biasanya, terdapat baik pada orang fertil, maupun pada infertil. Hanya saja pada orang fertil kadarnya sedikit saja. Ada batas minimum persentase abnormal terhadap normal. Jika persentase abnormal lebih banyak dibandingkan dengan persen spermatozoa normal, maka akan mengakibatkan infertilitas. Bentuk abnormal terjadi karena berbagai macam gangguan dalam spermatogenesis, terutama pada tahap spermiogenesis. Gangguan tersebut dapat diakibatkan oleh beberapa faktor

seperti faktor hormonal, nutrisi, obat, akibat radiasi, atau oleh penyakit (Yatim, 1994). Macam-macam jenis sperma dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Macam-macam jenis sperma  
(Sumber: Armatage, 2013)

Untuk membuat apusan (*Smear*) sperma, pertama-tama dilakukan pengolesan pada *object glass* dengan menggunakan albumin dan dibiarkan hingga mengering. Lalu suspensi sperma ditetaskan *di atas* gelas objek yang sudah diberi albumin dan dibiarkan mengering. Selanjutnya gelas objek direndam dalam alkohol bertingkat mulai dari 50%, 70% dan 90%, masing-masing selama 2 menit kemudian dilakukan pencucian menggunakan aquadest. Setelah itu, dilakukan pewarnaan menggunakan eosin 70% dan setelah itu dilakukan pembilasan menggunakan aquadest. Selanjutnya, *object glass* kembali dimasukkan ke dalam alkohol bertingkat (50%, 70% dan 90%). Kemudian dikeringkan dan disimpan di atas kertas hisap. Hasilnya dapat dilihat dibawah mikroskop, dan diberi tanda pada daerah ditemukannya sperma. Langkah selanjutnya adalah dilakukan penutupan *objek glass* menggunakan entelan (Budiono, 1992; Machmudin *et al.*, 2011).

#### f. Pembuatan Sayatan Histologi Testis

Sayatan histologi testis sangat diperlukan sebagai bukti penunjang dalam penelitian ini. Pengambilan organ yang akan diamati mulanya adalah dengan dimatikannya hewan yang akan diambil organnya dengan cara dislokasi leher atau dengan menggunakan ether/kloroform. Kemudian dengan menggunakan

alat bedah, jaringan atau organ yang akan digunakan dikeluarkan dan dengan segera dimasukkan kedalam larutan saline (NaCl 0.96%) untuk dibersihkan dari darah dan jaringan yang mengotorinya. Tahap selanjutnya merupakan tahap fiksasi, dimana organ direndam dalam larutan fiksatif (Bouins) selama 24 jam atau lebih. Kemudian masuk ke dalam tahap dehidrasi, dimana masing masing organ direndam dalam alkohol dengan konsentrasi meningkat (60, 70, 80, 90, 96 dan 100%) dengan masing-masing lama waktunya adalah 2 jam. Setelah tahap dehidrasi selesai, maka selanjutnya adalah proses clearing. Proses ini dilakukan dengan cara memasukkan organ ke dalam alkohol 100% : Xilol = 1:1 selama maksimal 10 menit, dan xilol murni maksimal 15 menit. Selanjutnya adalah tahapan infiltrasi, dimana kita membunuh oven dalam proses pengerjaannya. Objek atau preparat dimasukkan ke dalam parafin cair bersih pada suhu 58°C dengan waktu minimal parafin-xilol : 30 menit, parafin I 48°C : 1 jam dan parafin II 56° selama 1 jam. Setelah melewati tahapan di atas, maka organ sudah boleh dimasukkan ke dalam *block paraffin*, proses ini dinamakan proses *embedding* (Budiono, 1992; Machmudin, 2009).

Pada proses *embedding*, digunakan besi L yang diberi alas kaca yang nantinya sebagai tempat yang digunakan untuk menuangkan parafin. Setelah besi L siap, maka parafin dituangkan ke dalamnya dan ditunggu agar sedikit mengeras kemudian organ diletakan di atas nya dengan sangat hati-hati dan tuangkan kembali lapisan parafin selanjutnya. Jika pada permukaan parafin terdapat gelembung udara, maka gelembung dapat dihilangkan dengan menggunakan jarum khusus yang sebelumnya dipanaskan terlebih dahulu. Setelah *block* mengering, selanjutnya dilakukan penyayatan organ menggunakan mikrotom (Budiono, 1992; Machmudin, 2009).

Penyayatan dimulai dengan ketebalan 15 mikron dan selanjutnya menurun sampai 10 mikron. Tujuannya untuk membuang sisa parafin yang berada di ujung *block* organ. Hasil sayatan akan berbentuk pita tipis yang ditengahnya terdapat organ. Hasil pita ini dapat disimpan pada baki dan diberi penutup di bagian atasnya agar tidak terkena debu atau terkena angin. Setelah selesai

disayat, organ ditempelkan pada *object glass* yang sebelumnya telah dilapisi albumin dan diberi tetesan *aquadest*. Organ yang telah diletakan di atas *object glass* selanjutnya dipanaskan di atas *paraffin heater* bersuhu 45°C (Budiono, 1992; Machmudin, 2009).

Selanjutnya merupakan proses pewarnaan preparat histologi testis menggunakan pewarnaan HE (Hematoksilin Eosin). Dilakukan proses deparafinisasi dengan menggunakan xilol selama 30 menit dalam *coplin jar* terhadap objek yang telah ditempel. Hidrasi dilakukan dengan menggunakan konsentrasi alkohol menurun, mulai dari 100, 96, 90, 80 dan 70% dengan waktu masing-masing 3 menit. Sedangkan untuk proses pewarnaan menggunakan Hematoksilin Eosin, objek dapat direndam lebih lama. Setelah proses pewarnaan selesai, maka objek dibilas menggunakan *aquadest*. Selanjutnya proses dehidrasi dan pewarnaan menggunakan Eosin pada alkohol bertingkat (60, 70, 80, 90, 96 dan 100%) dengan waktu 3 menit pada setiap konsentrasi alkohol. Penjernihan kedua menggunakan xilol + alkohol 100% selama 3 menit dan selanjutnya dengan xilol murni selama 3 menit (Budiono, 1992; Machmudin, 2009).

## F. Analisis Data

Data hasil pengamatan motilitas spermatozoa dianalisis dengan uji Shapiro Wilk. Untuk analisis data secara kuantitatif, data yang diperoleh diolah dengan menggunakan Anova dan Beda Nyata Terkecil (BNT). Hal ini dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan pada masing-masing perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Apabila data yang didapatkan berupa data non parametrik, maka data dianalisis lebih lanjut dengan menggunakan Uji Tukey dan Uji Mann Whitney.

### G. Alur Penelitian

